

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-365177

(43)Date of publication of application : 18.12.2002

(51)Int.Cl.

G01N 1/10
G01N 1/28
G01N 27/447
G01N 27/62
G01N 33/483

(21)Application number : 2001-157248

(71)Applicant : PROTEOME SYSTEMS LTD
SHIMADZU CORP

(22)Date of filing : 25.05.2001

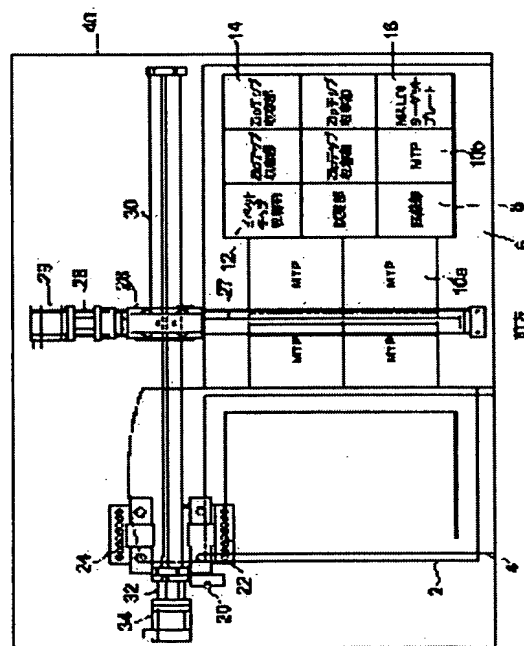
(72)Inventor : GOOLEY ANDREW ARTHUR
NGUYEN CHAU HOANG THANH
HUNTER WILLIAM SAMUEL
RAMSDEN ROBERT J

(54) PRETREATING DEVICE OF SAMPLE FOR MASS SPECTROMETRY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To facilitate sample preparation for MALDI-TOF MS.

SOLUTION: Gel is imaged by a scanner 2, and a spot is cut off by a cutter of a cutter part 20 and transferred to a well of MTP 10a. The gel is cleaned in the well and dried, and then enzyme liquid is dispensed, to digest a protein into a peptide. Extracted liquid is dispensed, and the peptide is extracted from the gel. Zip chip treatment of the extracted peptide is executed, and the peptide is mixed with a matrix and discharged onto an MS target plate, to thereby prepare the sample.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

BEST AVAILABLE COPY

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-365177

(P 2 0 0 2 - 3 6 5 1 7 7 A)

(43) 公開日 平成14年12月18日 (2002. 12. 18)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード	(参考)
G01N 1/10		G01N 1/10	F 2G045	
1/28		27/62	V 2G052	
27/447		33/483	F	
27/62		27/26	315 G	
33/483		1/28	M	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-157248 (P 2001-157248)

(22) 出願日 平成13年 5 月 25 日 (2001. 5. 25)

(71) 出願人 501067573

プロテオム システムズ リミテッド
オーストラリア国 ニューサウスウェールズ州 2113 ノース ライド ウォーター
ルー ロード 35-41

(71) 出願人 000001993

株式会社島津製作所
京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地

(72) 発明者 アンドリュー・オーサー・グーリー
オーストラリア国 2047 NSW ターラ
マーラ ケイティナストリート 15

(74) 代理人 100085464

弁理士 野口 繁雄

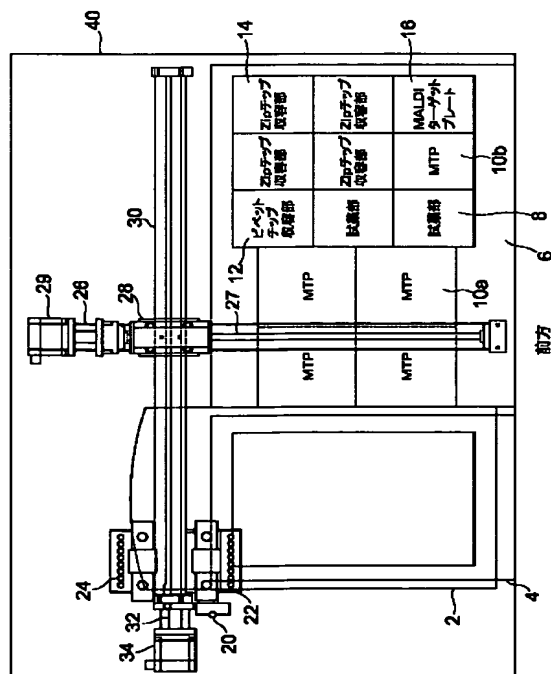
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 質量分析用試料の前処理装置

(57) 【要約】

【課題】 MALDI-TOF MS用の試料調製を容易にする。

【解決手段】 スキャナ 2 によりゲルを撮像し、カッター 20 のカッターによりスポットを切り取り、MTP 10 a のウエルへ移送する。ウエル内でゲルを洗浄し、乾燥させた後、酵素液を分注して蛋白質を消化しペプチドとする。抽出液を分注してゲルからペプチドを抽出させる。抽出したペプチドを Zip チップ処理し、マトリクスと混合して MS ターゲットプレートへ吐出して試料を作成する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 電気泳動を完了したゲル又は転写後のメンブランを保持し、その撮像と解析をする光学のスキャナ部と、

前記光学のスキャナ部により解析され、指定された泳動スポットの切出しをするカッター部と、

容器を保持し、その容器に前記カッター部により切り出されたスポットを收容し、スポットの蛋白質を消化してペプチドを抽出する消化部と、

質量分析計のターゲットプレート保持し、前記消化部で抽出されたペプチドをマトリクスとともに前記ターゲットプレート上に設置するマスローダー部と、

前記消化部で使用される酵素及び試薬を保持する試薬部と、

前記試薬部の酵素及び試薬を前記消化部に分注するとともに、抽出されたペプチドをマトリクスとともに前記ターゲットプレート上に移送するピペット機構と、

前記カッター部及び前記ピペット機構を必要な位置の間で移動させる移動機構と、

これら各部及び各機構を收容する筐体とを備えたことを特徴とする質量分析用試料の前処理装置。

【請求項2】 前記筐体はその内部を密閉状態にできるものである請求項1に記載の前処理装置。

【請求項3】 前記ゲル又は転写後のメンブランを光学のスキャナ部上で保持し、前記筐体内外で移送可能にするトレイを備えた請求項1又は2に記載の前処理装置。

【請求項4】 前記酵素、試薬及びターゲットプレートを保持し、前記筐体内外で移送可能にするトレイを備えた請求項1、2又は3に記載の前処理装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は、MALDI-TOF MS（マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計）を用いて、生体中の蛋白質の同定をするPMF法（Peptide MS Fingerprinting法）の前処理に使用する装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 MALDI-TOF MSを用いて、生体中の蛋白質を同定しようとした場合、MALDI-TOF MS測定用に試料を調製するには次の4つの前処理工程が必要である。

【0003】 ①電気泳動を完了したゲル又は転写後のメンブランにおいて、測定する試料スポットを定めるために、そのゲルなどを撮像し解析する工程。この工程は、主としてCCDカメラ、コンピューターなどを用いて行なわれているが、撮像にはフラットベッドスキャナを用いることもある。

②工程①で定められた、切り取るべき泳動スポットをカッターにより切り取る工程。

③切り取った泳動スポット中の蛋白質を酵素によりペプチドに分解し抽出する消化工程。

④抽出されたペプチドを質量分析計のターゲットプレートに設置して質量分析用試料を作成する工程。

【0004】 これらの4つの工程をそれぞれ単独に実行する機能を備えた装置が用いられている。また、これら4工程のうち、工程①と②を実行する機能を併せ持った装置、及び工程③と④を実行する機能を併せ持った装置も用いられている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 これらの前処理のために2～3台の装置が必要になり、広い設置スペースが必要になり、装置の購入費用がかさむばかりでなく、それらの装置間のサンプル移動には人手が必要であり、不便であった。また、それぞれの装置毎に運転のための操作が必要となり、作業効率向上の妨げとなっていた。装置間のサンプルの移動時や、全体カバーのない装置では、装置運転中や休止中に空中からの落下浮遊物（特にセラチン）が、MALDI-TOF MS測定に対し汚染による悪影響を与えている。

【0006】 本発明は、MALDI-TOF MSを用いて、生体中の蛋白質を同定するための測定用試料の調製を容易にし、かつ空中からの落下浮遊物による汚染を防ぐことのできる試料前処理装置を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明の質量分析用試料前処理装置は、電気泳動を完了したゲル又は転写後のメンブランを保持し、その撮像と解析をする光学のスキャナ部と、その光学のスキャナ部により解析され、指定された泳動スポットの切出しをするカッター部と、容器を保持し、その容器に前記カッター部により切り出されたスポットを收容し、スポットの蛋白質を消化してペプチドを抽出する消化部と、質量分析計のターゲットプレートを保持し、前記消化部で抽出されたペプチドをマトリクスとともに前記ターゲットプレート上に設置するマスローダー部と、前記消化部で使用される酵素及び試薬を保持する試薬部と、前記試薬部の酵素及び試薬を前記消化部に分注するとともに、抽出されたペプチドをマトリクスとともに前記ターゲットプレート上に移送するピペット機構と、前記カッター部及び前記ピペット機構を必要な位置の間で移動させる移動機構と、これら各部及び各機構を被って收容する筐体とを備えたものである。

【0008】 本発明では、4機能を装置1台に併せ持たせたことにより、設置スペースや購入費用の低減が可能となり、また装置間のサンプルの移動は不要となり、操作環境が統一される。装置全体を筐体内に收容したので、落下浮遊物からの隔離が可能になる。

【0009】

【発明の実施の形態】 各部及び各機構を收容する筐体はその内部を密閉状態にできるものとするのが好ましい。これにより、落下浮遊物からの隔離を一層よく行な

えるようになる。ゲル、メンブラン、前処理に使用する容器、試薬、MSターゲットプレートなどは装置のワークスペース内に設置されるが、ワークスペースには移動機構が存在し、装置運転中は駆動されているので、それらの部材や試薬を装置運転中に操作者が手動でワークスペースへ設置したり取り出したりする作業は危険である。

【0010】そのような危険を避け、装置運転中でもゲルや試薬などの交換を可能とするために、ゲル又は転写後のメンブランを光学的スキャナ部上で保持し、前記筐体内外で移送可能にするトレイを備えることが好ましい。また、酵素、試薬及びターゲットプレートを保持し、前記筐体内外で移送可能にするトレイを備えることも好ましい。

【0011】

【実施例】図1は一実施例の内部主要部の平面図である。2はその上部に設置された試料であるゲル又はメンブランを撮像し、解析をする光学的スキャナであり、ここではフラットベッドスキャナを使用する。スキャナ2上にゲル又はメンブランを設置するために試料用のトレイ4が設けられており、トレイ4はスキャナ2の上部に透明ガラス板を保持し、そのガラス板上にゲルやメンブランを設置できるようになっている。

【0012】トレイ4に隣接して試薬などを設置するトレイ6が配置されている。トレイ6上には酵素及び試薬を保持する試薬部8と、スキャナ2上で切り取られた試料スポットを収容し、酵素により消化してペプチドを抽出するための消化部としてのサンプルMTP(マイクロタイタープレート)10aと、脱塩溶液を収容するMTP10bと、蛋白質を消化しペプチドを抽出するための酵素や試薬を分注するためピペットチップを収容したピペットチップ収容部12と、抽出されたペプチドを脱塩・濃縮する μ -C18 Zipチップ (Millipore社) を収容したZipチップ収容部14と、MALDI用のターゲットプレート16とを備えている。MTP10aとしては96個のウェル、MTP10bとしては384個のウェルを備えたMTPが使用されており、MTP10aは最大で4個、MTP10bは1個配置されている。トレイ6上の各部材はトレイ6上に着脱可能に設置されている。

【0013】スキャナ2上で泳動スポットの切出しをするためにカッター部20が設けられている。カッター部20は垂直方向に設置された中空のパイプ状カッターを備え、そのパイプの先端をスキャナ上でゲル又はメンブランの肉厚方向に押し付けることにより、パイプ内にゲル又はメンブランを詰め込んで切り取る。カッター部20はそのパイプ状カッターにより切り取ったゲル又はメンブランをMTP10aのウェルに吐出するために純水を供給する機構も備えている。

【0014】ピペット機構としては8個のピペットを配

列し、同時に作動させるプローブ22が配置され、その8個のピペットはそれぞれのシリンジポンプ24により駆動されるようになっている。ピペットの先端にはピペットチップ収容部12のピペットチップ又はZipチップ収容部14のZipチップが着脱可能に取り付けられる。

【0015】カッター部20とプローブ22は、Z方向(紙面垂直方向：水平面に対する垂直方向)に移動するZ移動機構に取り付けられている。Z移動機構は圧縮空気の供給により駆動される空気シリンダーを備えてカッター部20とプローブ22を上下(Z方向)に移動させることができる。カッター部20とプローブ22の間にはクラッチ機構が設けられており、プローブ22を上下動させるときにはカッター部20も同時に移動し、カッター部20を上下動させるときにはプローブ22を停止させた状態でカッター部20のみが上下動するように、そのクラッチ機構が作動させられる。

【0016】そのZ方向移動機構は、トレイ4、6上の各部の上を水平面内のX方向(図で横方向)とY方向(図で縦方向)に移動するXY移動機構に取り付けられている。そのXY移動機構では、Y軸方向に固定されたYガイド軸26が筐体40に固定されており、Yガイド軸26上にはYガイド軸26に沿って移動するY移動部28が設けられている。Y移動部28はY軸方向に延びた棒ねじ27と螺合しており、その棒ねじ27が回転することによってYガイド軸26に沿ってY方向に移動させられる。29はその棒ねじ27を回転させるY駆動モータである。

【0017】Y移動部28にはYガイド軸26の下側(垂直方向の下側)を通してX方向に延びたXガイド軸30が固定されている。カッター部20とプローブ22のZ駆動部はXガイド軸30に移動可能に支持され、Yガイド軸26との交差部ではその下側を通るように、Xガイド軸30に取り付けられている。カッター部20とプローブ22のZ駆動部はX軸方向に延びた棒ねじ32と螺合しており、その棒ねじ32が回転することによってXガイド軸30に沿ってX方向に移動させられる。34はその棒ねじ32を回転させるX駆動モータである。この移動機構により、カッター部20とプローブ22は、X、Y、Z方向に自由に移動することができ、任意の位置へ移送できる。

【0018】この前処理装置は図2に示されるように筐体40内に収納され、筐体40はこれら各部を被い、密閉状態で収容している。トレイ4と6はそれぞれ独立して筐体40の内外で移送可能になっており、装置動作中でもゲル又はメンブランの交換や、試薬、チップ又はMTPなどの交換や補充をすることができるようになってい

【0019】次に、この実施例の動作について説明する。

(1)ゲルの撮像と切り取り

1. ゲルをトレイ4に置いてスキャナ2上に設置し、トレイ6上のサンプルMTP10aの位置には少なくとも1つのMTP10aを配置する。MTP10aはトレイ6上に4つまで設置することができる。MTP10aは96個のウェルを備えており、1つのMTP10aについて最大96個の試料スポットを採取することができる。

2. スキャナ2により撮像する。

3. 切り取るべきスポットを選び、切り取ったスポット10を移送するMTP10aのウェルを指定する。

4. ゲルの切り取りを開始する。

5. カッター部20のカッターが切り取るべきスポット上に移動し、ゲル上に水を所定量吐出する。カッターがそのスポット上に降下しゲルの肉厚方向に押し付けられることによりそのスポットを切り取り、吸引することにより切り取ったゲルをカッター内に収容する。カッターが上昇し、移動機構により、指定されたMTP10aのウェル上へ移動し、吐出することにより、切り取ったゲルをウェルへ水と共に排出する。

6. 必要な全てのスポットを切り取るまでステップ5を繰り返す。

【0020】(2)切り取ったゲルの洗浄と脱色

(2-1)ゲル吐出時の水分除去

1. ブローブ22のピペットには前の操作で使用したチップが装着されているので、ブローブ22をチップ排出位置へ移動し、チップを排出する。なお、ブローブ22には8個のピペットが設けられているので、それら8個のピペットについて同時に処理を行う。以下のステップにおいても同じである。

2. ブローブ22がドレインへ移動し、シリンジポンプ24により水を吐出することによりピペットを洗浄する。

3. ブローブ22がピペットチップ部12の位置へ移動し、チップを装着する。

4. ブローブ22がサンプルMTP10aへ移動し、ウェル内の溶液を吸引する。

5. ブローブ22がドレインへ移動し、吸引した溶液を排出する。

6. 全てのウェルの溶液を排出するまでステップ4-540を繰り返す。

【0021】(2-2)ゲルの洗浄

8. ブローブ22が試薬部8の洗浄液上に移動し、洗浄液を所定量吸引する。

9. ブローブ22がサンプルMTP10a上へ移動し、洗浄液をウェルに分注する。

10. ステップ8と9を繰り返し、MTP10aの全てのウェルに洗浄液を入れる。

11. 室温又は37℃で一定時間保持する。

12. ブローブ22がMTP10aに移動し、洗浄液を50

吸引する。

13. ブローブ22がドレインへ移動、吸引した洗浄液を排出する。

14. ゲルが脱色するまでステップ8-13を数回繰り返す。

【0022】(2-3)ゲルの乾燥

21. ブローブ22が試薬部8の乾燥溶媒上へ移動し、乾燥溶媒を所定量吸引する。

22. ブローブ22がMTP10aへ移動し、乾燥溶媒を分注する。

23. ステップ21-22を繰り返し、MTP10aの全てのウェルに乾燥溶媒を分注する。

24. 室温又は37℃で所定時間保持する。

25. ブローブ22がMTP10aへ移動し、ウェルの乾燥溶媒を吸引する。

26. ブローブ22がドレインへ移動し、吸引した乾燥溶媒を排出する。

27. ステップ25-26を繰り返し、MTP10aの全てのウェルから乾燥溶媒を除去する。(なお、ここでのステップ21-27は省略することもできる。)

28. ブローブ22がチップ排出位置へ移動し、チップを排出する。

29. ブローブ22がドレインへ移動し、シリンジポンプ24から水を供給することにより、ピペットを洗浄する。

30. MTP10aを真空乾燥機へ移動させ、ゲルスポットを乾燥させる。又は、37℃で所定時間保持して乾燥させてもよい。このステップ30でのMTP10aの移送は手動で行う。

【0023】(3)ゲル内での消化

(3-1)チップの準備

1. ゲルが脱水した後、MTP10aをトレイ6上に置き、この装置内に戻す。このステップも手動で行う。

2. ブローブ22がチップ排出位置へ移動し、チップを排出する。

3. ブローブ22がドレインへ移動し、シリンジポンプ24から水を供給することによりピペットを洗浄する。

4. ブローブ22がピペットチップ収容部12へ移動し、チップを装着する。

5. 空気を所定量吸引する。

【0024】(3-2)酵素液分注

6. ブローブ22が試薬部8の酵素溶液の位置へ移動し、酵素溶液を所定量吸引する。

7. ブローブ22がMTP10aへ移動し、ウェルに酵素溶液を分注する。

8. ステップ6-7を繰り返し、MTP10aの全てのウェルに酵素溶液を入れる。

【0025】(3-3)消化

9. ブローブ22がチップ排出位置へ移動し、チップを排出する。

10. プローブ22がドレインへ移動し、シリンジポンプ24から水を供給してピペットを洗浄する。

11. プローブ22がホームポジションに戻る。

12. MTP10aを封止用のテープで封止し、37℃で少なくとも4時間又は30℃で一晩保持する。このステップ12は手動で行う。

【0026】(4)抽出

(4-1)チップの準備

1. MTP10aをトレイ6に載せ、この装置内に戻す。この操作も手動で行う。

2. プローブ22がチップ排出位置へ移動し、チップを排出する。

3. プローブ22がドレインへ移動し、シリンジポンプ24から水を供給してピペットを洗浄する。

4. プローブ22がピペットチップ部12へ移動し、チップを装着する。

【0027】(4-2)抽出液の分注

5. プローブ22が試薬部8の抽出液の位置へ移動し、抽出液を所定量吸引する。

6. プローブ22がMTP10aへ移動し、ウエルに抽出液を分注する。

7. ステップ5-6を繰り返し、MTP10aの全てのウエルに抽出液を入れる。

【0028】(4-3)抽出

8. MTP10aをインキュベータへ移動して30℃で30分間保持し、抽出液中の残存する有機溶媒を除去する。

【0029】(5)Zipチップ処理及びMSターゲットプレートへの試料調整

(5-1)MTP10bへの脱塩溶液の準備

1. MTP10aをトレイ6に載せてこの装置内に戻す。このステップは手動で行う、

2. プローブ22がチップ排出位置へ移動し、チップを排出する。

3. プローブ22がドレインへ移動し、シリンジポンプ24から水を供給してピペットを洗浄する。

4. プローブ22が試薬部8の脱塩溶液へ移動し、脱塩溶液をシリンジに所定量吸引する。

5. プローブ22がMTP10bへ移動し、各ウエルに脱塩溶液を分注する。そのMTP10bのウエルの位置はMSターゲットプレート16上の位置と対応している。

6. ステップ4-5を繰り返し、指定された全てのウエルに脱塩溶液を入れる。

【0030】(5-2)Zipチップの平衡化

7. プローブ22がZipチップ部14へ移動し、Zipチップを装着する。

8. プローブ22が試薬部8の湿潤溶液へ移動し、湿潤溶液の吸引と吐出を数回繰り返してZipチップを湿潤させる。

【0031】(5-3)Zipチップの洗浄

9. プローブ22が試薬部8の平衡溶液へ移動し、平衡溶液の吸引と吐出を数回繰り返してZipチップを平衡化する。

【0032】(5-4)サンプルの吸着

10. プローブ22がMTP10aへ移動し、サンプルの吸引と吐出を同じ位置で数回繰り返す。

【0033】(5-5)脱塩

11. プローブ22がMTP10bへ移動し、MTP10bのウエルに入っている脱塩溶液を所定量吸引する。プローブ22がドレインへ移動し、脱塩溶液を排出する。

12. ステップ11を更に数回繰り返す。

【0034】(5-6)マトリクス混合の溶出液吸引

13. プローブ22が試薬部8のマトリクス溶液へ移動し、空気を所定量吸引後、プローブ22が下降してピペットがそのマトリクスを所定量吸引する。

【0035】(5-7)MSターゲットプレートへの吐出

14. プローブ22がMSターゲットプレート16へ移動する。その位置はMTP10aの指定ウエルと対応している。

15. プローブ22が降下し、ZipチップがMSターゲットプレート16の表面に接触する。これにより溶液がMSターゲットプレート16に分注される。

16. プローブ22がチップ排出位置へ移動し、Zipチップを排出する。

17. ステップ7-16を全てのサンプルが処理されるまで繰り返す。

18. MSターゲットプレート16上の試料が完全に乾燥すれば、そのMSターゲットプレート16を質量分析計に設置し、スペクトルを取得することができる。

【0036】図1に示した実施例では、スキャナ2としてフラットベッドスキャナを使用しているが、スキャナとしては受光素子を実施例のY方向に移動する移動機構に取り付け、受光素子を走査する方式のものにしてもよい。またコンピューターによりMTP10aを温度制御し、各恒温保持工程をトレイ6上で行わせるようにしてもよい。さらにMTP10aの封止を自動化することにより、全行程を完全自動化することも可能である。

【0037】

【発明の効果】本発明の質量分析用試料前処理装置は、質量分析用試料の調整に必要な4機能を装置1台の装置で実現できるようにしたので、設置スペース・購入費用の低減が可能となり、また装置間のサンプルの移動は不要となり、操作環境が統一される。また、装置全体を筐体内に収容したので、落下浮遊物からの隔離が可能になる。その筐体の内部を密閉状態にできるものとするれば、落下浮遊物からの隔離を一層よく行なえるようになり、より精度の高い分析が可能になる。ゲル、メンブラン、前処理に使用する容器、試薬、チップ、MSターゲット

プレートなどをトレイに設置し、そのトレイを前記筐体内外で移送可能にすれば、それらの部材や試薬の交換や設置をワークスペースの外側で行うことができるようになり、操作者にとって安全であり、また作業効率の向上が可能になる。

【図面の簡単な説明】

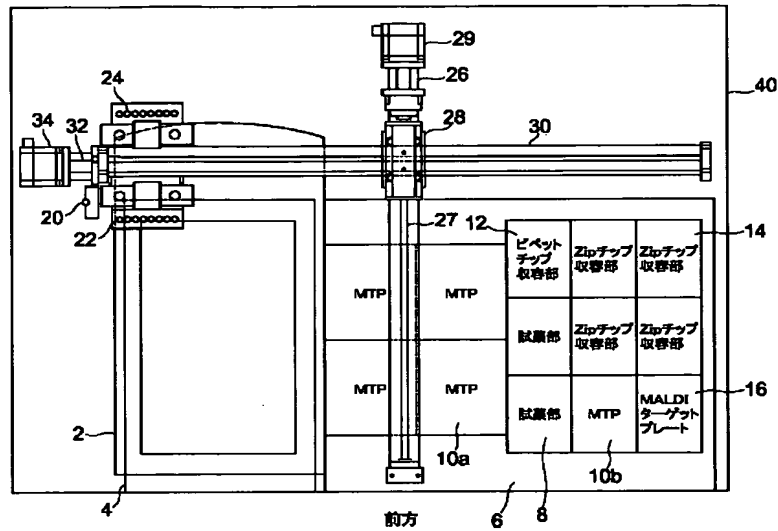
【図1】一実施例の要部平面図である。

【図2】

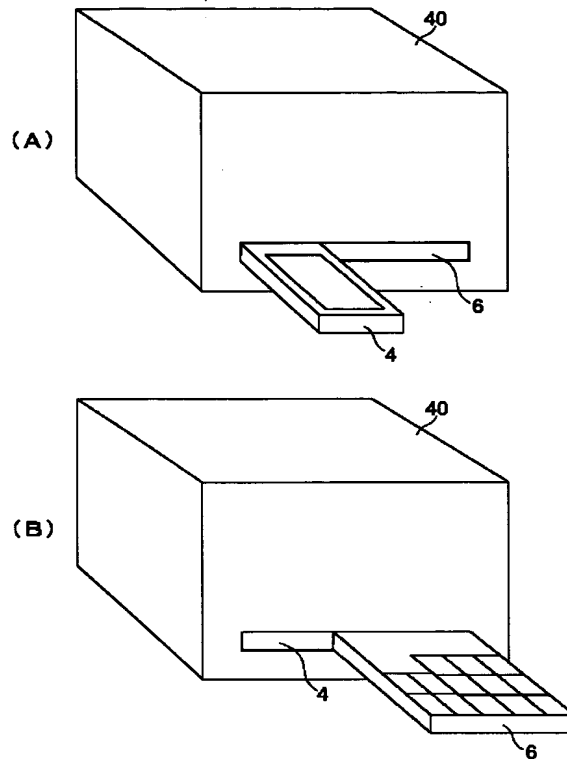
2 スキャナ
4, 6 トレイ

8 試薬部
10a, 10b マイクロタイタープレート
12 ピペットチップ収容部
14 Zipチップ収容部
16 MALDI用ターゲットプレート
20 カッター部
22 ピペットを備えたプローブ
26 Yガイド軸
28 Y移動部
30 Xガイド軸
32 X移動部

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I
G 0 1 N 1/28

特マコード (参考)

G

(72) 発明者 チャウ・ホアン・タン・ニュグエン
オーストラリア国 3079 ビクトリア ア
イバンホー ビーティストリート 57
(72) 発明者 ウィリアム・サミュエル・ハンター
オーストラリア国 3032 ビクトリア ア
スコットベール ザパレード 28

(72) 発明者 ロバート・ジョン・ラムスデン
オーストラリア国 2079 NSW マウン
トコラー スプリングプレイス 29
F ターム (参考) 2G045 BA11 BB60 DA36 FB01 FB05
JA11
2G052 AA28 AB16 AB18 AD17 BA02
BA15 CA03 CA04 CA18 FD03
GA24